

Susanne Sebens, Alexander Arlt, Heiner Schäfer, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Labor für Molekulare Gastroenterologie & Hepatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel.

08. August 2006

Entwicklung neuer Therapiekonzepte in der Behandlung des Pankreaskarzinoms: NF- κ B als Molecular Target

Die konservative Therapie des exokrinen Pankreasadenokarzinoms erweist sich nach wie vor als schwierig und wenig erfolgreich, was nicht zuletzt durch die ausgeprägte Resistenz dieser Tumore gegenüber Zytostatika bedingt ist. Ein Faktor, der wesentlich zur Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz beiträgt, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die pharmakologische Inhibition dieses Faktors stellt somit eine plausible Strategie dar, chemoresistente Tumore gegenüber Zytostatika zu sensitivieren.

Das exokrine Pankreaskarzinom ist immer noch ein sehr schwierig und wenig erfolgreich therapierbarer Tumor und zählt daher zu den häufigsten Ursachen krebserkrankter Todesfälle (1; 2). Ein wesentlicher Grund dafür ist neben der späten Diagnose in der ausgeprägten Chemoresistenz dieser Tumore zu sehen. Ein Ziel zur Verbesserung der bestehenden Therapien ist folglich, Resistenzmechanismen aufzuklären und Strategien zu deren Überwindung zu entwickeln. Hieraus sollten sich neue Möglichkeiten ergeben, die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Zytostatika entscheidend zu verstärken. Ein wichtiger Mechanismus, durch den sich Tumorzellen der Zytostatikawirkung entziehen, stellt der umfassende Schutz vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) dar. Eine molekulare Determinante, die im Zusammenhang mit Apoptoseprotektion und Zytostatikaresistenz identifiziert werden konnte, ist der Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa B (NF- κ B).

Funktion und Regulation von NF- κ B

NF- κ B ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der unter physiologischen Bedingungen ein wichtiges Regulativ in Immun- und Entzündungsreaktionen darstellt (3). Zur NF- κ B/Rel-Familie gehören 5 Proteine (RelA/p65, RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100), die als Homo- oder Heterodimere den funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bilden. Bislang am meisten untersucht und offenbar physiologisch am relevantesten ist das Heterodimer p50/p65. In seiner inaktiven Form liegt dieser Transkriptionsfaktor an seinen Inhibitor I κ B gebunden im Zytoplasma vor (Abb. 1). Nach entsprechender Stimulation z.B. durch Zytokine, Stress, bakterielle oder virale Infektionen kommt es zur Aktivierung des I κ B-Kinase Komplexes (IKK), der wiederum die Phosphorylierung von I κ B bewirkt. Dieses wird anschließend zunächst einer bestimmten Polypeptidmodifikation (Poly-Ubiquitinierung) und danach einer spezifischen proteolytischen

Degradation durch das 26S-Proteasom zugeführt. Hierdurch wird NF- κ B freigesetzt, welches somit in den Zellkern translozieren und zur Expression von einer Vielzahl von Genen führen kann (4), die u.a. für Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie anti- und proapoptische Proteine kodieren. Dadurch werden grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung maßgeblich von NF- κ B reguliert und beeinflusst.

Die Rolle von NF- κ B in der Karzinogenese und in der Vermittlung von Chemoresistenz

Da die Aktivierung von NF- κ B durch eine Vielzahl von Faktoren induziert wird und NF- κ B selbst wiederum zur Expression verschiedenster Proteine beiträgt, ist dieser Transkriptionsfaktor in einer ganzen Reihe von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen wie z.B. der Karzinogenese von elementarer Bedeutung (5; 6). Eine konstitutive Aktivität von NF- κ B findet man in vielen hämatologischen Tumorerkrankungen (5; 7) sowie in soliden Tumoren – z.B. des Kolons (8), der Prostata (9) und des Pankreas (6; 10; 11). Diese erhöhte NF- κ B Aktivität kann in Tumorzellen über die vermehrte Bildung von proangiogenetischen Faktoren (z.B. IL-8, VEGF) und einer verstärkten Tumervaskularisierung sowie über eine Veränderung von Adhäsionsmolekülen zur Erhöhung des Migrations- und Invasionspotenzials der Tumorzellen beitragen (12; 13). Ferner resultiert aus einer erhöhten NF- κ B Bindungsaktivität auch eine Verschiebung der Balance von Überlebens- und Todessignalen zugunsten von Überleben und Apoptoseschutz. Diese erhöhte Protektion der Tumorzellen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli kann über verschiedene Mechanismen vermittelt werden, u.a. durch die Hochregulation von anti-apoptotischen Molekülen wie z.B. Bfl-1/A1 oder cIAP1 (14; 15), von Proteinen, die entscheidend den Ablauf des Zellzyklus steuern (16). Dadurch wird nicht nur das Überleben genetisch transformierter Zellen gefördert, sondern auch ein elementarer Grundstein für den erhöhten Schutz vor Zytostatika induzierter Apoptose gelegt. Dieser NF- κ B abhängige Apoptoseschutz wird in Pankreaskarzinomzellen offenbar sowohl intrinsisch, z.B. durch Tumor-Stroma-Interaktionen (17) als auch extrinsisch, d.h. durch die Chemotherapie selbst induziert (18). Somit kann die konstitutive Aktivierung von NF- κ B in Tumorzellen als eine entscheidende molekulare Determinante in der Karzinogenese wie auch in der Chemoresistenz angesehen werden.

0

Inhibition von NF- κ B als Strategie zur Chemosensitivierung

Die pharmakologische Inhibition von NF- κ B stellt daher eine plausible Strategie dar, um chemoresistente Tumore gegenüber einer Zytostatikatherapie zu sensitivieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte in vitro (10; 19; 20) und in vivo mittels präklinischer Tumormausmodelle (21; 22) zeigen, dass durch die Inhibition von NF- κ B chemoresistente Pankreaskarzinomzellen deutlich gegenüber Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen (Gemcitabine, 5-Fluorouracil, Etoposid, Doxorubicin) sensitiviert werden können, was sich in einer stark erhöhten Apoptoserate widerspiegelt. Ferner scheint es durch die Inhibition von NF- κ B auch zu einer reduzierten Tumervaskularisierung und infolgedessen zu einer Verschlechterung der Tumormikroumgebung zu kommen, so dass darüber ein weiterer Antitumoreffekt (21; 22) erzielt wird.

Einsatz von NF- κ B Inhibitoren in klinischen Studien

Mittlerweile existiert eine Vielzahl an Inhibitoren, die die Aktivierung von NF- κ B an verschiedenen

Punkten im NF- κ B Signalweg verhindern können. Da sich die meisten dieser Substanzen jedoch noch in experimentellen Testungen befinden, soll im folgenden nur auf solche NF- κ B Inhibitoren eingegangen werden, die bereits in der Klinik etabliert sind bzw. in klinischen Studien Anwendung gefunden haben (Abb. 1).

Bortezomib

Seit 2002 wurde der Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade®) in einer ganzen Reihe von Phase-I- und -II-Studien bei einer Vielzahl von Tumoren, u.a. dem fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, eingesetzt. Bisher wurden vor allem vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen wie z.B. dem Multiplen Myelom erzielt. In einer Phase-II-Studie mit 669 Patienten war die Monotherapie mit Bortezomib einer Monotherapie mit Dexamethason signifikant überlegen mit einer medianen progressionsfreien Zeit von 189 versus 106 Tage ($p < 0,001$), 1-Jahres-Überleben von 80% versus 60% ($p < 0,003$) sowie einer Ansprechrate (komplettes und partielles Ansprechen) von 38% versus 18% ($p < 0,001$) (23). Bei der Behandlung von soliden Tumoren hat sich die Monotherapie mit Bortezomib bisher als wenig wirksam erwiesen, so dass weitere Studien vor allem in Kombination mit Zytostatika anzustreben sind. Zur Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms wurde bisher eine Phase-II-Studie mit 87 Patienten durchgeführt, in der die Wirksamkeit von Bortezomib allein oder in Kombination mit Gemcitabine untersucht wurde (24). Beide Behandlungen führten zu keinen verbesserten Ansprech- und Gesamtüberlebensraten im Vergleich zu der Standardtherapie mit Gemcitabine allein. Anzumerken ist, dass die Gemcitabine-Monotherapie nicht Bestandteil dieser Studie und ein direkter Vergleich damit nicht gegeben war. Als eine weitere Schwäche dieser Studie ist die Tatsache zu bewerten, dass Patienten, die unter Monotherapie mit Bortezomib eine Tumorprogression zeigten, in die Gruppe der Kombinationstherapie wechseln konnten, so dass der Effekt der Kombinationstherapie möglicherweise abgeschwächt wurde. Letztendlich ist bei dieser Substanz zu bedenken, dass Bortezomib durch Blockade des 26S-Proteasoms nicht nur den Abbau des NF- κ B Inhibitors I κ B und damit die Aktivierung von NF- κ B verhindert, sondern dass es dadurch auch zu einer Anreicherung von Proteinen kommen kann, die möglicherweise die Tumorprogression weiter fördern (z.B. -Catenin).

Die Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit zytostatisch wirkenden Substanzen zur Behandlung von soliden Tumoren ist daher im Rahmen von klinischen Studien weiterhin zu evaluieren.

Thalidomid

Thalidomid, welches in den 60er Jahren als Sedativum eingesetzt wurde, ist ein Pharmakon, das bereits aufgrund seiner Angiogenese hemmenden Wirkung in zahlreichen klinischen Studien zur Behandlung von verschiedenen Tumorerkrankungen eingesetzt wurde. Thalidomid unterbindet durch Inhibition der IKK-Aktivität die Aktivierung von NF- κ B (25). In der Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen konnten im Rahmen von klinischen Studien bereits erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt werden. So war in einer Phase-III-Studie mit 107 Patienten mit Multiplen Myelom, einer Tumorentität mit ebenfalls hoher NF- κ B-Aktivität, die Kombination aus Thalidomid und Dexamethason einer Monotherapie mit Dexamethason deutlich überlegen (Ansprechrate: 63% vs. 41%, $p < 0,002$) (26). Im Rahmen einer randomisierten, plazebokontrollierten Studie konnte an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom gezeigt werden, dass Thalidomid in einer gut tolerierbaren Dosis effektiv in der Behandlung der Tumorkachexie war, welche ebenfalls stark NF- κ B abhängig ist. Patienten, die über 8 Wochen täglich eine Dosis von 200 mg Thalidomid erhielten, wiesen einen Gewichtsverlust von 0,06 kg

auf, wohingegen in der Placebogruppe im Mittel ein Gewichtsverlust von 3,62 kg zu verzeichnen war (27).

Die Tumorprogression von soliden Tumoren konnte durch Thalidomid als Einzeltherapie allerdings nicht verzögert werden, so dass weitere Studien unter Einsatz von Thalidomid in Kombination mit Zytostatika angestrebt werden sollten (28).

CHS-828

Der IKK-Inhibitor CHS-828 wurde bisher nur in Phase-I-Studien als Monotherapie zur Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt. Als Primärziele wurden definiert, sowohl die Toxizität als auch die maximal tolerierbare Dosis zu bestimmen (29; 30). Als Monotherapie scheint CHS-828 bei soliden Tumoren jedoch zu keinem objektiven Tumoransprechen zu führen, so dass die Autoren den Einsatz dieser Substanz in Kombination mit anderen Pharmaka empfehlen.

Sulfasalazin

Sulfasalazin gehört in die Gruppe der nonsteroidal anti inflammatory drugs (NSAID) und hemmt NF- κ B über die Unterbindung der I κ B Kinase-Aktivität. Es ist ein bereits lange in der Klinik etabliertes Pharmakon, das vor allem zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt wird. Momentan wird Sulfasalazin im Rahmen einer Phase-I/II-Studie als Monotherapie zur Behandlung von 20 Patienten mit malignen Gliomen eingesetzt, in der als Primärziel die Findung der maximal tolerierbaren Dosis und als Sekundärziel die klinische und/oder radiologische Antwort definiert wurde (31).

Basierend auf unseren umfassenden experimentellen und präklinischen Untersuchungen soll nun – ausgehend von der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel – multizentrisch eine prospektive, offene Pilotstudie ohne Kontrollgruppe durchgeführt werden, um zunächst die Verträglichkeit und Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus Gemcitabine und Sulfasalazin in der Behandlung des fortgeschrittenen duktales Pankreasadenokarzinoms zu untersuchen. Diese Studie soll einarmig an 20 Patienten mit einem fortgeschrittenen, nicht operablen Pankreasadenokarzinom durchgeführt werden. Alle Patienten erhalten die Standardtherapie mit Gemcitabine und zusätzlich Sulfasalazin. Das primäre Ziel dieser Studie ist die Machbarkeit und Sicherheit der Kombination aus Gemcitabine/Sulfasalazin. Der primäre Endpunkt ist die Behandlungsdauer der Patienten, definiert als Zeitraum vom Beginn der Sulfasalazin-Behandlung bis zum Abbruch der Kombinationstherapie. Die Therapie wird abgebrochen, wenn die Machbarkeit und Sicherheit nicht mehr gegeben sind, und zwar im Falle einer Tumorprogression oder bei inakzeptablen toxischen Reaktionen. Als sekundärer Endpunkt wird die Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus Sulfasalazin und Gemcitabine definiert, und zwar gegeben durch die komplette Remissionszeit, die Überlebenszeit sowie die progressionsfreie Zeit.

Fazit

Zusammenfassend stellt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine vielversprechende molekulare Zielstruktur dar, die zur Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika genutzt werden kann. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien, in denen NF- κ B-Inhibitoren zur Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen eingesetzt wurden, sind vielversprechend. Die zügige Durchführung weiterer Studien mit selektiven NF- κ B-Inhibitoren in Kombination mit Zytostatika, d.h. als Chemosensitizer, ist daher vor allem bei Patienten mit

soliden Tumoren, z.B. mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, dringend anzustreben.

Quelle: Literatur:

- 1: Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM: Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology* 2005; 128: 1606-1625.
- 2: Böhmig M, Rosewicz S: Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 261-268.
- 3: Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.
- 4: Schmid RM, Adler G: NF κ B/Rel/I κ B: Implications in Gastrointestinal Diseases. *Gastroenterology* 2000; 118: 1208-1228.
- 5: Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS: A requirement for NF- κ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 1998; 12: 968-981.
- 6: Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ: The nuclear factor- κ B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 119-127.
- 7: Bargou R, Emmerich F, Krappmann J et al.: Constitutive activation of NF- κ B RelA is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2961-2969.
- 8: Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M et al: Regulation of NF- κ B activity by I κ B-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* 1999; 18: 2567-2577.
- 9: Domingo-Domenech J, Mellado B, Ferrer B et al.: Activation of nuclear factor- κ B in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. *Br J Cancer* 2005; 93: 1285-1294.
- 10: Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M et al.: Inhibition of NF κ B sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 2001; 20: 859-868.
- 11: Mürköster S, Arlt A, Sipos B, et al.: Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor- κ B activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1316-24.
- 12: Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal BB: Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- κ B activation by inhibiting I κ B α kinase activation, thereby suppressing NF- κ B regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem* 2005; 280: 17203-17212.
- 13: Uzzo RG, Crispen PL, Golovine K, Makhov P, Horwitz EM, Kolenko VM: Diverse effects of zinc on NF- κ B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis* 2006; Epub ahead of print.
- 14: Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C: The prosurvival bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 382-387.
- 15: Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Roedel JV, Baldwin AS: NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683.
- 16: Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M: NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2690-2698.
- 17: Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al.: Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 β . *Cancer Res* 2004; 64: 1331-1337.
- 18: Sebens Mürköster S, Lust J, Arlt A, et al.: Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells - Induced secretion of IL-1 β and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene*; 2006; 25: 3973-3981.
- 19: Arlt A, Vorndamm J, Mürköster S et al.: Autocrine production of Interleukin-1- β confers constitutive NF κ B activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 910-916.

- 20: Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S et al.: Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma celllines against Gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003; 22: 3243-3251.
- 21: Muerkoester S, Arlt A, Witt M et al.: Usage of the NF-kB inhibitor Sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 469-476.
- 22: Muerkoester S, Arlt A, Gehrz A et al.: Autokrine IL1,-Sekretion führt zu erhöhter NF-kB Aktivität und zu Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen in vivo. *Med Klinik* 2004; 99(4): 185-90.
- 23: Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al.: Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2487-2498.
- 24: Alberts SR, Foster NR, Morton RF, et al.: PS-341 and Gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) randomized phase II study. *Annals Oncology* 2005; 16: 1654-1661.
- 25: Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr: Inhibition of NF-kappaB activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol. Chem* 2001; 276: 22382-22387.
- 26: Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR, Eastern Cooperative Oncology Group: Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 431-436.
- 27: Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T, Goggin PM: Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomized placebo controlled trial. *Gut* 2005; 54: 540-545.
- 28: Eisen T, Boshoff C, Mak I, et al.: Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 812-817.
- 29: Hovstadius P, Larsson R, Jonsson E, et al.: A Phase I study of CSH 828 in patients with solid tumor malignancy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2843-2850.
- 30: Ravaud A, Cerny T, Terret C, et al.: Phase I study and pharmacokinetic of CHS-828, a guanidino-containing compound, administered orally as a single dose every 3 weeks in solid tumours: An EORTC study. *Eur J Cancer* 2005; 41: 702-707.
- 31: Robe PA, Martin D, Albert A, Deprez M, Chariot A, Bours V: A phase 1-2, prospective, double blind, randomized study of the safety and efficacy of Sulfasalazine for the treatment of progressing malignant gliomas: study protocol of (ISRCTN45828668). *BMC Cancer* 2006; 6: 29-32.